est très curieux: il s'agit de *Brookesia stumpffi* Boettg., le genre *Brookesia* étant endémique à Madagascar et tout proche des *Chamaeleon*; or, *B. stumpffi* a réalisé la formule d'équilibre caractéristique de *C. fischeri* et de nombreux Sauriens: 2**N** = 12 **M** + 24 **m**. Cette formule qui n'a pas été rencontrée chez les Caméléons *s. s.* de Madagascar, réapparaît donc dans cette île, mais dans un genre voisin.

AUTEURS CITÉS

Matthey, R. 1931. *Chromosomes de Reptiles. Sauriens, Ophidiens, Chéloniens. L'évolution de la formule chromosomiale chez les Sauriens.* R. S. Zool., 38, 117-186.

— 1932. *Les chromosomes de l'Amphisbénien acrodonte: Trogonophis wiegmanni Kaup.* Arch. Zool. Exp., 74, 193-203.

— 1933. *Nouvelle contribution à l'étude des chromosomes chez les Sauriens.* Rev. suisse Zool., 40, 281-316.

— 1943. *Le problème des hétérochromosomes chez les Sauropsidés. Reptiles.* Arch. J. Klaus Stift., 18, 1-16.

Matthey, R. et J. M. van Brink. 1956. *La question des hétérochromosomes chez les Sauropsidés. I. Reptiles.* Experientia, 12, 53.

Werner, F. 1911. *Chamaeleontidae* (Das Tierreich). Berlin, Friedländer und Sohn.

White, M. J. D. 1954. *Animal cytology and Evolution.* Cambridge Univ. Press.

N° 11. **Fritz E. Lehmann, Ermanno Manni** und **Angelo Bairati,** Berne. — Der Feinbau von Plasmalemma und kontraktiler Vakuole bei *Amoeba proteus* in Schnitt- und Fragmentpräparaten.

(Zoologisches Institut der Universität, Bern.)

1. Plasmalemma und kontraktile Vakuole als zellbiologische Strukturen

Bei Feinschnittuntersuchungen an Zellen aus kompakten Organen ist es meist sehr schwierig, die gefundenen Feinstrukturen mit den biologischen Leistungen der untersuchten Zellen eindeutig

in Beziehung zu setzen. Wesentlich günstiger liegen die Verhältnisse bei einzelnen Zellen, die ohne weiteres der Lebenduntersuchung zugänglich sind. Hier kann der Feinbau der Zellorganoide mit feststellbaren Leistungen der lebenden Zelle verknüpft werden. Aus diesem Grunde haben wir *Amoeba proteus* als Untersuchungsobjekt gewählt. Über die zellbiologischen Leistungen von *Amoeba* liegt bereits eine ansehnliche Literatur vor, ebenso ist der Feinbau der lebenden *Amoebe* ziemlich gut bekannt. So erscheint es als besonders aussichtsvoll von dieser breiten Grundlage von Tatsachen aus die funktionelle Feinstruktur der Zellorganoide von *Amoeba* mit Hilfe des Elektronenmikroskopes zu studieren. Bei der Neuheit der elektronenmikroskopischen Methoden und ihrer steten Umgestaltung bedürfen die erzielten Resultate wiederholter und kritischer Überprüfung.

Das hat sich im jetzigen Zeitpunkt besonders für den Feinbau des Plasmalemmas wie der Wand der kontraktilen Vakuole (K. V.) deutlich gezeigt. Diese beiden membranösen Gebilde besitzen eine schleimige polysaccharidhaltige Grenzhaut, die einer zweiten vermutlich fibrillären Schicht aufliegt. Die Verschiedenheit des Brechungsindizes der beiden Schichten ergibt eine deutlich Formdoppelbrechung (Bairati und Lehmann 1953, 1956). Die fibrilläre Schicht in der Wand der kontraktilen Vakuole scheint die strukturelle Grundlage der Kontraktilität zu sein. Die starke Verformbarkeit des Plasmalemmas lässt gleichfalls daran denken, dass eine aus fibrillären Elementen bestehende Lamelle im Plasmalemma als kontraktiles Element von Bedeutung wäre. Mit der von uns bisher geübten Fragmentierungstechnik hat sich die Frage des Schichtenbaues beim Plasmalemma und bei der Wand der K. V. nicht eindeutig entscheiden lassen, erst die Untersuchung von ultrafeinen Schnitten, die der eine von uns (Manni) neuerdings hergestellt hat, lässt eine Präzisierung unserer bisherigen Vorstellungen zu.

2. Methoden zur Gewinnung optimaler Strukturbilder

Unsere bisherigen Resultate haben es uns ermöglicht, verschiedene Fixierungsmethoden miteinander zu vergleichen. In dieser Arbeit werden wir nun auch die Resultate der Fragmentierung und der Dünnschnitte nebeneinander betrachten können. Wir halten dieses vergleichende Vorgehen in der Entwicklung der elektro-

nenmikroskopischen Untersuchungstechnik für unerlässlich und wir bedauern es sehr, dass in anderen Laboratorien eine ganz ungerechtfertigte Beschränkung auf die Fixierung mit OsO_4 und die Dünnschnittechnik erfolgt ist.

2 *a*. Optimale Fixierung von Fragmenten. Fragmente von Membranen, die ohne die Prozeduren der Einbettungstechnik unmittelbar nach der Fixierung aufgetrocknet werden können, erleiden, ähnlich wie auch die Direktpräparate von Geisseln relativ geringe sekundäre Veränderungen. Sie können deshalb als sehr wertvolles Testobjekt für die Güte einer Fixierungsmethode verwandt werden. Die membranöse wie die fibrilläre Feinstruktur kann, wie wir früher fanden, am besten durch folgendes Vorgehen erhalten werden (Bairati und Lehmann 1954): Vorbehandlung der lebenden *Amoebe* mit dem Komplexon Versene (0.0005 M) zur Stabilisierung der Plasmastrukturen. Fixierung mit Bouins Gemisch und Nachbehandlung mit OsO_4. Diese Verfahren haben nun auch für die Dünnschnitte des Plasmalemmas Bilder ergeben, die denen weit überlegen sind, die mit der Fixierung nach Palade erhalten wurden.

2 *b*. Schneidetechnik. Wir haben die Einbettung in einem Gemisch von Butyl- und Methylmethacrylat nach den üblichen Vorschriften vorgenommen. Die Objekte wurden mit Glasmessern auf einem Trüb-Täuber Mikrotom geschnitten. Die Schnittdicke betrug zwischen 50 und 30 mμ. Die Schnitte wurden in einem Trüb-Täuber Elektronenmikroskop an der Abt. für Elektronenmikroskopie des Chemischen Institutes untersucht.

3. Der Feinbau des Plasmalemmas

Vorbehandlung mit Versene und kurzdauernde Fixierung bei 0° (Bouin 15 Min., OsO_4 15 Min.) haben im Vergleich mit den anderen angewandten Fixierungsmethoden die besten Resultate ergeben. Versene-Bouin bei 0° gibt vergleichbare Bilder; Bouin allein oder Pallade (S. Abb. 3 *a*) allein erhalten die Schleimschicht schlecht. Auf den gut fixierten Schnitten findet sich ein deutlich zweischichtiges Plasmalemma, ähnlich wie wir es (1953, Bairati und Lehmann) in Abb. 8 B auf Grund der Doppelbrechung als möglich erachtet hatten (s. Abb. 1). Die äussere vermutlich mucoprotein-

reiche Schicht ist ähnlich feingranuliert wie auf den Fragmentpräparaten. Scharf abgegrenzt (dies ist von Bedeutung für die Deutung der gefundenen Formdoppelbrechung) liegt unter der Schleimschicht eine sehr dichte, Mikrosomen enthaltende Haut, die

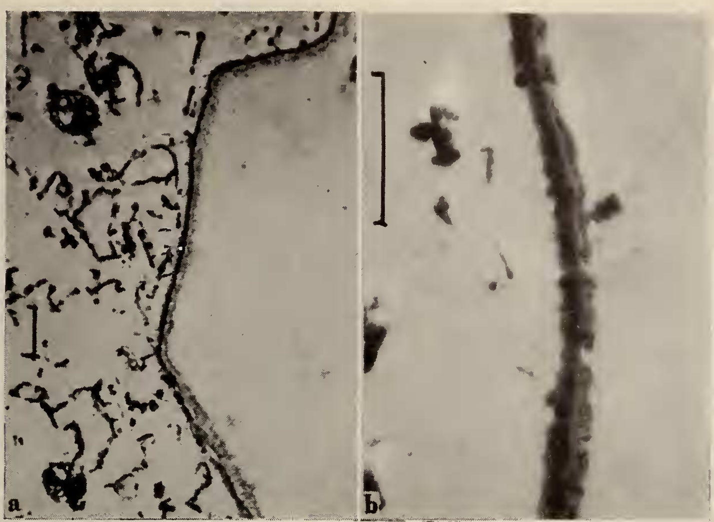


ABB. 1.

Plasmalemma von *Amoeba*: Fixiert nach Vorbehandlung mit Versene in Bouin und OsO_4 bei 0°. (s. Text). Der Strich bedeutet bei allen Abb. 1 μ.

a) Uebersichtsbild bei schwacher Vergrösserung (1: 6.000). Das Plasmalemma erscheint im Querschnitt als Doppelschicht: aussen die schleimige Schicht, gegen das Plasma die dichte Fibrillärschicht, darunter das Reticulum des Plasmagels.

b) Detailbild bei 1: 20.000. Die Schleimschicht zeigt eine feine Granulierung, die dichte innere Schicht mit einzelnen Mikrosomen grenzt in scharfer Kontur an die Schleimschicht.

stellenweise auf das engste mit der unmittelbar anschliessenden Fibrillärschicht des Hyaloplasmas verbunden ist (Abb. 2). Diese wohl hyaloplasmatische Schicht ist von uns seinerzeit auf den Fragmentpräparaten nicht mit Sicherheit identifiziert worden, da wir damals noch nicht mit Versene gearbeitet haben, und andere Fixierungsmethoden diese Schicht strukturell sehr schlecht erhalten. Das hat uns dann weiterhin zu einer teilweisen Verwechslung von Plasmalemma- und Vakuolenfragmenten geführt, indem wir alle membranösen Fragmente aus vakuolenhaltigen Amoeben-

stücken mit gut erhaltener Fibrillärstruktur als Fragmente der K. V. ansahen. In dieser Hinsicht bedarf nun unsere Darstellung in Bairati und Lehmann 1954 einer Korrektur, ebenso in Lehmann und Bairati 1956. Hingegen geben die neuen Befunde eine klare

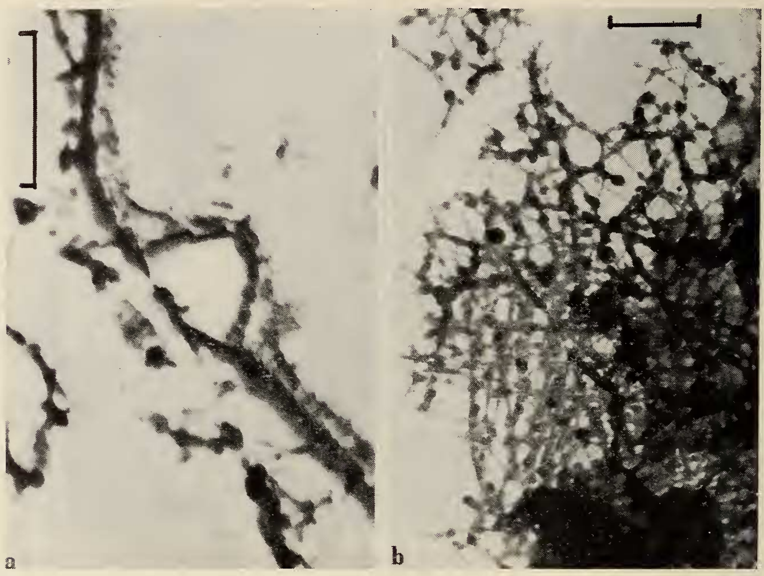


Abb. 2.

Beziehungen der hyaloplasmatischen fibrillären Textur zum Plasmalemma.

a) Schnitt durch Plasmalemmafalte (1: 20.000). In der Falte und neben ihr (oben im Bilde) hebt sich von der inneren Plasmalemmaschicht fibrilläres Material ab, das vermutlich einer tieferliegenden Folie angehört. (S. Abb. 2 *b*).

b) Fragment des Plasmalemmas, dem am Rande eine solche fibrilläre Folie anhaftet (1: 12.000). Rechts im Bilde im dunkeln Teil befindet sich noch Plasmalemma. Links das mehr oder weniger orthogonale Faserreticulum gehört zu einer u n t e r dem Plasmalemma gelegenen Schicht.

strukturelle Grundlage für unsere polarisationsoptischen Befunde. Ferner können wir aus ihnen Hinweise auf eine strukturelle und funktionelle Differenzierung des Plasmalemmas entnehmen. Die mucoproteidreiche Aussenschicht dürfte mit der Regelung der Permeabilität und des Haftvermögens zu tun haben, während die innere Folie aus vermutlich kondensiertem Hyaloplasma mit ihrer Textur von fibrillärem Material und Mikrosomen als Trägerin des Stoffwechsels und der Kontraktilität in Frage kommt. Diese Schicht

steht zudem in engstem Kontakt mit grossen fibrillären Folien von oft derben, sich kreuzenden Fibrillen aus dem vermutlich gelierten Teil des Hyaloplasmas. (Abb. 2 *a* und 2 *b*.)

Von diesen ersten Resultaten aus dürfte es möglich sein, weiter einzudringen in die Zusammenhänge von Feintextur und Beweglich-

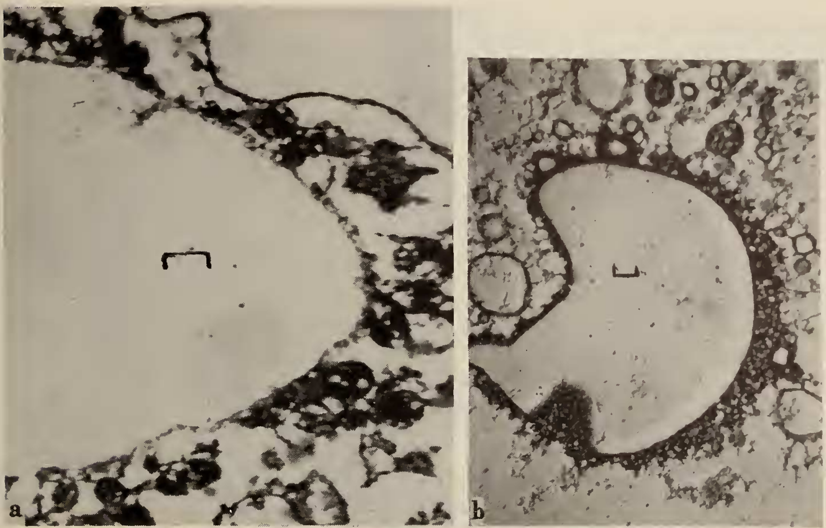


Abb. 3.

a) Vakuole in fortgeschrittener Diastole (1: 6.000). Fixierung Bouin-OsO_4. Rechts oben Plasmalemma ohne erhaltene Schleimschicht. Darunter Mitochondrien und Wand der K.V.

b) Vakuole in beginnender Diastole (1: 3.500). Fixierung nach Palade. Links oben im Bilde zwei kleine Divertikel der Vakuole. Unten eine tangential geschnittene Vorwölbung.

keit bei der *Amoebe*. Ferner stellt sich die Frage wie weit sich die von uns bei *Amoeba* nachgewiesene Doppelschichtigkeit der Plasmahaut auch bei anderen Zellen nachweisen lässt, wenn diese mit verschiedenen Fixierungsmethoden untersucht werden.

4. Die Wand der kontraktilen Vakuole

Je nach dem Kontraktionszustand der Vakuole im Moment der Fixierung ist die Wand von sehr verschiedener Dicke (Abb. 3 *a*

und Abb. 3 *b*). Bei stark gedehnten Vakuolen ist sie wesentlich dünner als das Plasmalemma (Abb. 3 *a*). Gegen das Lumen zu findet sich eine sehr zarte kontinuierliche Schicht (Abb. 4 *a*), die bei stärker kontrahierten Vakuolen deutlich schleimig erscheint (Abb. 4 *b*); eine wahrscheinlich mucoproteidreiche Innenschicht.

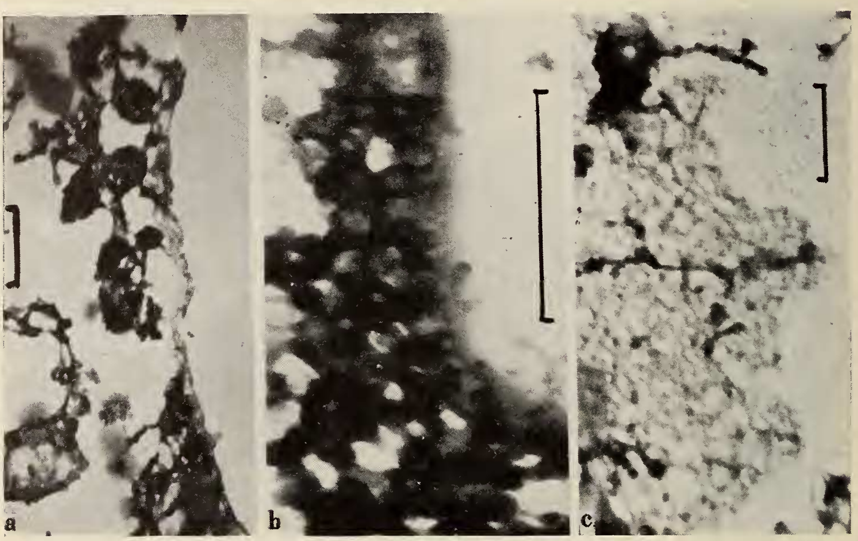


Abb. 4.

Struktur der Wand der kontraktilen Vakuole.

a) Wand einer Vakuole in Diastole (1: 10.000). Vorbehandlung Versene. Fixierung Bouin-OsO_4 bei 0°. Zarte Innenschicht. Aussen Gruppe von Mitochondrien.

b) Tangentialschnitt einer Vakuolenwand in beginnender Diastole (1: 30.000). OsO_4-Fixierung nach Palade. Das Maschenwerk in der Innenschicht ist z.T. in Form dunkler Ringe zu erkennen.

c) Flächenpräparat eines Fragmentes (1: 12.000). Fixierung wie Abb. 4 *a*. Die maschige Struktur in der Membran ist ähnlich wie auf Schnitt 4 *b*.

Diese lässt sich mit Versene-Vorbehandlung weniger gut erhalten als die Schleimschicht des Plasmalemmas. Es ist überhaupt fraglich, ob das Versene in ausreichendem Masse in das Innere der *Amoebe* eindringt und die Wand der kontraktilen Vakuole erreicht. In engem Kontakt mit der Innenschicht steht eine zweite netzig fibrilläre Lage, deren Maschen auf Tangentialschnitten durch die Wand (Abb. 4 *b*), wie auf Totalpräparaten von Fragmenten ein ähnliches Muster zeigen (Abb. 4 *c*). Hier handelt es sich wohl um

den kontraktilen Anteil. Nach aussen gegen das Hyaloplasma schliesst sich ein Kranz zahlreicher Mitochondrien an, die durch ein Reticulum mit der kontraktilen Vakuole verbunden sind (Abb. 3 *a* und *b*). Die Mitochondrien lassen weder nach Palladefixierung noch nach Versenebehandlung einen lamellären Bau erkennen, sondern zeigen ein reticuläres Innere mit einigen grösseren Vakuolen. Die gedehnte Wand der K. V. ist somit dem Plasmalemma relativ ähnlich. Einzig ist sie wesentlich dünner. Fragmente können deshalb bei wenig genauer Prüfung leicht mit Fragmenten des Plasmalemmas verwechselt werden (s. oben).

Die Wand der K. V. ist zu Beginn der Diastole sehr dick und enthält meist kleinere oder grössere Vakuolen, die sich noch nicht mit dem Hauptraum vereinigt haben. Beim lebenden Tier ist leicht festzustellen, dass der Hauptraum der Vakuole oft durch Zusammenfliessen mehrerer zunächst getrennter Bläschen entsteht. Demnach muss man sich das Gefüge der lebenden Vakuolen als sehr plastisch vorstellen. Das betrifft sowohl die Mucoproteinauskleidung wie auch das kontraktile Reticulum und ebenso die exkretorisch tätigen Bestandteile der Vakuolenwand. Hier bietet sich der korrelierten feinstrukturell-physiologischen Forschung noch ein weites Feld.

5. Vergleichende Auswertung verschiedener Strukturbilder

Man wird wohl bei der weiteren Strukturanalyse zwei wesentliche Gesichtspunkte einigermassen deutlich auseinanderhalten müssen. Die Erfassung gröberer Strukturanteile, die auch mit lichtmikroskopischen Methoden am lebenden Objekt nachkontrolliert werden können umfasst das Gebiet von ca 500—100 mμ. Die Erfassung feinster Strukturdetails, die sich einer lichtmikroskopischen Kontrolle entziehen erstreckt sich von 100 mμ bis in die Dimension von ca. 10 mμ.

Unsere Befunde lassen deutlich genug erkennen, dass schon die Darstellung relativ derber Strukturen manchmal auf erhebliche Schwierigkeiten fixiertechnischer Natur stösst. So ist der Nachweis der Zweischichtigkeit des Plasmalemmas, der bereits polarisationsoptisch angedeutet war, erst gelungen, als die

Versenestabilisierung und die Fixierung mit Bouin eingeführt wurde. Nun erst liess sich die Schleimschicht genügend gut erhalten und die Fibrillärstruktur, die bei OsO_4-Behandlung weitgehend verloren geht, kam jetzt klar zum Vorschein. Diese Beobachtung lässt wohl vermuten dass das Kapitel „Fibrillärstrukturen des Zytoplasmas“ mit der Anwendung von OsO_4 allein nicht bewältigt werden kann.

Ferner ist zu beachten, dass die Behandlung des an der Amoebenoberfläche liegenden Plasmalemmas für die Versene-Bouinbehandlung besonders gute Chancen bietet. Für die im Plasma-Innern liegende kontraktile Vakuole sind offenbar die Verhältnisse wieder etwas anders und weniger günstig. Hier muss nach weiteren Fixierungsmethoden gesucht werden. Die Anwendung von 20 %igem Formalin, dem ca. 15 Vol.-prozente Aceton zugesetzt waren, liefert bei der Erhaltung von fibrillären Gebilden ebenfalls vielversprechende Befunde und soll in Zukunft weiter ausprobiert werden.

Somit ist heute die gute Erhaltung der gröberen Zellkomponenten noch durchaus kein gelöstes Problem. Es kann aber leicht weiterverfolgt werden, weil hier lichtoptische Kontrollmethoden vorliegen.

Wesentlich anders liegen die Dinge bei der Erfassung allerfeinster Strukturen. Hier ist eine Anwendung lichtoptischer Kontrollen überhaupt nicht mehr möglich. Es kommen nur noch Vergleichsuntersuchungen an verschieden fixiertem Material in Frage. Aber hierzu gibt es fast noch keine Befunde, da die allgemeine Tendenz sehr stark auf die alleinige Verwendung von OsO_4 ausgerichtet ist. Somit ist heute eine sichere Beurteilung der vielen beschriebenen „Feinst“-Strukturen in den wenigsten Fällen möglich.

Bei der weiteren Erforschung der *Amoebe* mit der Elektronenmikroskopie wird es vor allem nötig sein, zu einer gesicherten Erfassung der sogenannten „gröberen“ Strukturen zu gelangen, wie es hier für den Feinbau des Plasmalemmas und der kontraktilen Vakuole dargelegt wurde. Hier ergeben sich bereits für die zellbiologische Forschung verschiedene wichtige Probleme.

Die Arbeit wurde ausgeführt mit Unterstützung der Stiftung Dr. J. de Giacomi und des Schweiz. Nationalfonds.

LITERATURVERZEICHNIS

BAIRATI, A. und LEHMANN, F. E. 1951. *Diversi costituenti della Amoeba proteus (plasmalemma, ialoplasma, vacuoli) esaminati al microscopio elettronico.* Pubbl. Staz. Zool. Napoli 23: 193.

— 1953. *Structural and chemical properties of the plasmalemma of amoeba proteus.* Exp. Cell. Res. 5: 220.

— 1954. *Partial disintegration of cytoplasmic structures of amoeba proteus after fixation with osmium tetroxide.* Exp. 10: 173.

— 1956. *Structural and chemical properties of the contractile vacuole of amoeba proteus. Protoplasma* (Wien) 5: 525.

LEHMANN, F. E. 1955. *Die submikroskopische Organisation der Zelle.* Klin. Wochenschr. 33: 294.

— 1956. *Der Feinbau von Kern und Zytoplasma in seiner Beziehung zu generellen Zellfunktionen.* In: Ergebnisse der medizinischen Grundlagenforschung B. 1 Verlag Thieme.

— MANNI, E. und GEIGER, W. 1956. *Der Schichtenbau des Plasmalemmas von Amoeba proteus im elektronenmikroskopischen Schnittbild.* Naturwiss. 43: 91.

N° 12. **Peter Bopp,** Basel. — Zur Topographie eines Kolonialterritoriums bei Murmeltieren.

(Mit 3 Abbildungen.)

(Sekretariat des Schweizerischen Bundes für Naturschutz.)

Die im Gebiet des Freibergs Kärpf (Kt. Glarus) begonnenen Studien an Murmeltierterritorien wurden Juli-August 1955 fortgesetzt. Dabei wurden zwei benachbarte Familienterritorien in hügeligem Biotop (Abb. 1) topographisch aufgenommen. Die Alp ist während des Sommers zeitweise mit Vieh bestossen. Die Kolonie befand sich 1920 m ü. M., an einem steilen, E-exponierten Hang, der mit Zwergerlenbüschen bestanden ist (In dieser Gegend konnten Murmeltierbaue bis 2400 m ü. M. beobachtet werden).

Die topographischen Verhältnisse sind in Abb. 2 dargestellt: Familienterritorium I ist rund 1500 m², FT II rund 2000 m² gross. Beide Territorien sind durch Wechsel miteinander verbunden.